

제초제 quizalofop-ethyl 분석법에 관한 연구

김희권, 김병호, 심재한¹⁾, 서용택¹⁾
전남농촌진흥원식물환경과, ¹⁾전남대학교 농과대학 농화학과

Study on analysis method of herbicide quizalofop-ethyl

Hee-kwon Kim, Byeong-Ho Kim, Jae-Han Shim¹⁾, Yong-Tack Shu¹⁾(Chonnam Provincial Rural Development Administration Plant Environmental Division, Naju chonnam Korea, 523-830 ; ¹⁾Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National university, kwangju korea 500-757)

Abstract : These studies were conducted to develop analysis method of herbicide quizalofop-ethyl by Gas Liquid Chromatography (GLC) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in soil and plant.

Quizalofop produced by hydrolysis of quizalofop-ethyl was conjugated with bovine serum albumin (BSA). Quizalofop antibody was developed in rabbits by using BSA conjugation. Antibody titer, incubation temperature, and incubation time was 32,000, 37°C and 4 hours respectively. Minimum detection limit of quizalofop-ethyl by ELISA was 5ppb. Quizalofop-ethyl recovery from soil by ELISA was more than 95 percent. Minimum detection limit of quizalofop-ethyl by GLC was 5ppb. Quizalofop-ethyl recovery from soil by GLC was from 89 percent to 100 percent. Minimum detection limit of quizalofop-ethyl by HPLC was 100ppb. Quizalofop-ethyl recovery from soil by HPLC was 89.6 percent.

緒 論

Quizalofop-ethyl은 1983년 Sakata 등¹⁾에 의해 제조활성이 발견된 이래 화분과 잡초를 방제하기 위하여 전세계적으로 광범위하게 사용되고 있음에도 불구하고 토양 및 식물체 내에 잔류하는 quizalofop-ethyl의 분석에 관한 연구는 HPLC에 의한 분석법에 의존하고 있다. 그러나 HPLC에 의한 방법은 검출한계가 높아 극히 미량 분석할 수가 없다. GLC는 농약에 따라 아주 낮은 검출한계까지 분석이 가능하지만 시료추출 및 정제과정이 복잡할 뿐만 아니라 많은 시간과 경비가 소요되며, 비휘발성 농약은 분석할 수 없다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 새로 개발된 방법이 면역 검정법이다. 일반적으로 이 방법에 의한 농약 분석법은 GLC나 HPLC를 이용한 분석방법 보다는 분석시간이 절약되고 재현성과 응용범위가 넓기 때문에 잔류분석에 아주 유용한 방법이다.^{2,3,4,5)} 따라서 저자는 GLC와 면역 검정법에 의한 quizalofop-ethyl의 분석법을 개발하고 기존의 HPLC법과 비교 연구한 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

Enzyme immunoassay에 의한 quizalofop-ethyl 분석

Immunogen (quizalofop-BSA conjugate)의 조제

Quizalofop-ethyl(98%) 1g을 100ml의 등근 플라스크에 넣고 6N의 NaOH용액 50ml을 가해, 80°C의 water bath에서 2시간 동안 환류반응 시킨다. 반응이 종결된 후 phenolphthalein 2방울을 가하여 conc. HCl로 하얀 앙금이 생길 때 까지 중화시킨다. 중화된 용액을 Toyo No.2 여지로

여과하고 여지를 50°C의 oven에서 건조시킨 다음 결정을 긁어 모아 UV 구조를 확인 하였으며 생성된 quizalofop 150mg을 1ml의 DMF (dimethyl formamide)에 용해시켜 90mg의 dicyclohexyl carbodiimide와 105mg의 N-hydroxy succinimide를 첨가하였다. 반응액을 20°C에서 3시간동안 서서히 교반하여 침전물은 원심분리하여 제거하였다. BSA (bovine serum albumin) 100mg을 5ml의 증류수에 녹여 1.05ml의 DMF를 서서히 가한 후 상기의 반응액에 적가 시키면서 교반하였다.

반응이 완결된 후 4°C에서 PBS-t에 대해 24시간 투석하여 -20°C에서 면역 주사전까지 보관하였다. 조제된 항원의 단백질 함량은 Lowry 등⁶⁾의 방법으로 측정하였다.

항체 (polyclonal antibody)의 생산

항체 생산은 이 등⁷⁾의 방법에 준하여 quizalofop-BSA conjugate 1mg을 0.14N NaCl용액 1ml에 녹여 Freund's complete adjuvant 1ml와 1:1의 비율로 주사기를 이용하여 잘 혼합한 뒤 토끼의 목부분 4곳에 피하 주사하였다. 면역 촉진 주사는 최초 주사 3주 후에 immunogen과 Freund's incomplete를 동일한 방법으로 1차 면역 촉진 주사하고 이어서 2주 간격으로 면역 촉진 주사를 2회 실시 하였다. 면역 촉진 주사기간 중에는 매 주사 1주 후에 토끼의 귀 부분 정맥으로부터 채혈하여 항체의 생성과 역가를 조사하였으며 최종 면역 촉진 주사 1주후에 본 실험에 사용할 항혈청을 채혈하였다. 채혈된 항혈청은 4°C에서 하룻밤 정치하여 혈장과 분리시키고 다시 10,000xg로 15분간 원심분리하여 0.1ml씩 유리 vial에 넣어 -20°C에 보관하였다. 분리된 항혈청의 역가 검사는 indirect ELISA에 의하여 실시하였다.

Coating antigen (Cag)의 조제

Coating antigen은 Hammock 등⁸⁾의 방법에 따라 quizalofop 56mg을 anhydride dioxane 2ml에 용해시킨 후 교반하면서 IBCF 25μl와 tri-n-butylamine 50μl를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 ovalbumin 130mg을 용해시킨 0.2N NaHCO₃ (pH 9.3) 용액 9ml를 적가하고 6시간 동안 25°C에서 방치하였다. 반응이 완결된 후 증류수에 대해 3일간 투석하고 동결 건조하여 -20°C에 보관하였다.

Indirect ELISA에 의한 항체의 역가 검정

생성된 항체에 대한 역가검정은 이 등⁹⁾의 방법에 따라 96-well microtiter plate에 quizalofop-BSA 결합체 200μl를 옮기고 4°C에서 하룻밤 배양하여 항원을 고정시킨 후에 PBS-t로 3회 세척하고 quizalofop 항혈청액을 10, 100, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000, 32000 배를 연속 희석하여 이들 희석액 200μl를 각 well에 가하였다. 희석된 항혈청액이 첨가된 plate는 37°C에서 2시간 배양하고 항혈청액을 제거한 후 PBS-t로 3회 세척하였다. 세척 후 antirabbit IgG-peroxidase conjugate 희석액 (1:1000)을 200μl 첨가하고 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양 후 PBS-t로 3회, 증류수로 2회 세척한 plate을 기질용액 o-phenylene diamine 200μl를 첨가하여 암조건의 실온에서 30분간 방치 후 60% H₂SO₄용액 50μl를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 plate는 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체의 역가를 결정하였다.

Quizalofop-ethyl 잔류 분석을 위한 Competitive ELISA

Competitive ELISA는 Riggle 등⁹⁾의 방법을 수정하여 96-well microtiter plate에 200μl의 coating antigen 용액을 가하여 4°C에서 하룻밤 배양하고 plate를 PBS-t로 3회 세척하였다. Plate에 100μl의 시료액과 항혈청액 100μl를 가하여 37°C에서 45분간 배양 후 PBS-t로 3회 세척하고 antirabbit IgG -peroxidase conjugate 200μl를 가한 후 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양된 plate를 PBS-t로 3회 세척하고 기질용액 o-phenylene diamine 200μl를 가하여 암조건의 실온에서 30분동안 배양하였으며 60% H₂SO₄ 용액 50μl를 가하여 반응을 종결시키고 각 well의 O.D값을 492nm에서 측정하고 O.D값을 표준 검량곡선에 비교하여 quizalofop-ethyl의 잔류량을 결정하였다.

ELISA를 이용한 회수율 시험

Quizalofop-ethyl이 0.1, 0.5ppm 수준으로 처리된 토양시료 50g에 100ml의 acetone을 가하여 추출하고 Buchner funnel로 감압여과하여 여액중의 acetone을 감압 농축기를 사용하여 증발시킨후 분액 깔대기에 옮겨 증류수 200ml와 포화식염수 20ml를 가한 다음 n-hexane 100ml를 첨가하여 quizalofop-ethyl을 n-hexane층으로 이동시킨다. 물층을 버리고 n-hexane층을 무수 Na₂SO₄로 탈수시켜 n-hexane을 감압 농축시킨 다음 DMF 5ml로 재용해시켜 앞에서 말한 competitive ELISA 과정대로 실시하여 검량곡선과 비교 회수율을 결정하였다.

Gas chromatography에 의한 quizalofop-ethyl의 분석

추 출

토양시료 50g을 稱量하여 acetone 100ml와 증류수 50ml를 가하여 150rpm으로 1시간동안 진탕시킨후 Buchner funnel

에 Toyo No. 2 여지와 celite를 5mm의 두께로 깔고 감압 여과 하였다. 여액중의 acetone을 감압 농축기를 사용하여 증발시킨 다음 1l의 분액 깔대기에 옮겨 증류수 200ml와 포화식염수 20ml를 가한 후 n-hexane 100ml를 첨가하여 quizalofop - ethyl을 n-hexane층으로 이동 시켰다. 물층을 버리고 n-hexane층을 무수 Na₂SO₄로 탈수시켜 10ml가 되도록 농축하였다.

정제 (clean up)

농축된 시료를 내경 2cm의 glass column에 10g의 florisil을 n-hexane 70ml로 slurry packing 시켜 hexane 을 florisil 표면에서 2mm 정도 남도록 용출 시킨 후 그 위에 무수 Na₂SO₄ 1g을 넣고 시료를 loading하였다. Pre-elution 용매(1% acetone in n-hexane) 100ml를 통과시켜 버린 후 elution 용매(3% acetone in hexane) 100ml를 다시 통과시켜 200ml의 등근 플라스크에 받아 농축시킨 후 5ml의 n-hexane으로 재용해하여 GLC 분석시료로 하였으며 GLC 분석 조건은 table 1과 같다.

Table 1. Analytical condition of quizalofop-ethyl by GLC

Instrument : Hewlett Packard 5890 series II gas chromatograph
Detector : ⁶³ Ni - ECD (electron capture detector)
Column : Hewlett Packard HP608 (0.53um × 30m)
Temperature :
Column : 270°C
Injector : 290°C
Detector : 290°C
Carrier gas(N ₂) flow rate : 25ml/min
Injection volume : 1 μl

HPLC에 의한 quizalofop-ethyl 분석

토양중의 quizalofop-ethyl의 추출 및 정제 과정은 GLC분석법과 동일하다. 다만 정제 후 최종 분석시료는 acetonitrile 5ml에 용해시켰으며 HPLC의 분석조건은 table 2와 같다.

Table 2. Analytical condition of quizalofop-ethyl by HPLC

Instrument : HPLC with waters 510 pump.
486 UV absorbance tunable detector
Column : Zorbax ODS stainless steel column (4.6 × 250mm)
Mobile phase : 80% acetonitrile in deionized water
Flow rate : 1 ml/min
Wavelength : 254 nm
Detector AUFS : 0.05
Integrator ATTN : 32
Injection volume : 10 μl
Column Temp : 40°C

結果 및 考察

ELISA에 의한 quizalofop-ethyl의 분석

제조제 quizalofop-ethyl를 가수분해하여 얻은 물질에 BSA를 결합시킨 quizalofop-BSA를 spectrophotometer를 이용하여 파장 254nm에서 측정한 결과 spectrum이 각기 다르게 나타남을 알 수 있었다.

토끼 3마리에 주사하여 생성된 항체에 대한 역가는 모두 32,000으로 나타났다. Schwalbe 등¹⁰⁾은 quizalofop-ethyl과 유

사한 화학적 구조를 갖춘 phenoxy계 제초제 diclofop의 fluoro immunoassay 실험에서 염소에서 얻은 항체의 역가는 30,000 이라고 하였으며 이 등⁷⁾은 endosulfan의 ELISA 실험에서 토끼에서 얻은 항체 역가는 32,000으로 본 실험 결과는 이들의 결과와 유사하였다. Quizalofop-ethyl 잔류 분석을 위한 최적조건을 구하기 위하여 microwell plate에 피복하는 Cag의 농도는 Fig. 1과 같이 0.5~20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 O.D 값이 급격히 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 거의 일정한 수준을 유지하였다. 따라서 quizalofop-ethyl의 Cag 최적농도는 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 결정하였다.

Coating antigen의 배양온도와 배양시간에 대한 실험에서 4, 20, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 공히 4시간 배양까지 O.D값이 증가하였다. 온도에 따른 O.D값은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 민감하게 나타났다 (Fig. 2).

토끼에서 quizalofop-BSA에 대해 생성된 항체 최적 희석 배수를 결정하기 위한 실험결과는 항체의 농도가 낮아질수록 O.D 값이 낮아지고 희석배수를 4,000배 이상 희석한 항체의 O.D 값의 기울기가 낮아 ELISA 분석에 적절하지 못하였으며 희석배수 2,000배가 안정적이며 기울기가 커 quizalofop-ethyl의 ELISA를 위한 적정 희석배수로 결정되

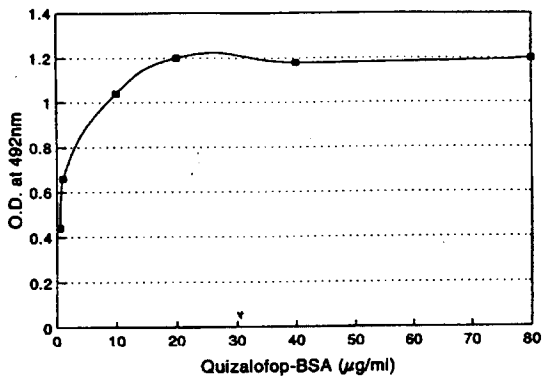


Fig 1. Effect of varying the coating concentration of quizalofop-BSA conjugate on the binding of a fixed amount albumine

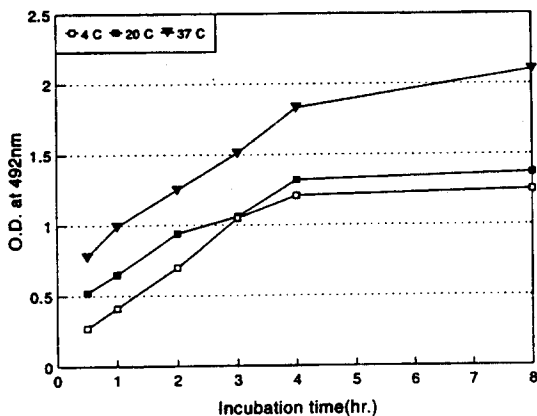


Fig 2. Effect of time and temperature on the coating antigen.

었다. 같은 희석배수 내에서는 quizalofop-ethyl의 농도가 증가할수록 O.D 값이 낮아졌다.

Quizalofop-ethyl을 분석하기 위한 ELISA 표준곡선은 Fig. 3과 같이 quizalofop-ethyl의 농도가 1000ng/ml까지 직선으로 나타났으며 최소 검출한계는 5ng/ml (5ppb)였다. ELISA에 의한 다른 농약들의 최소 검출한계는 endo-sulfan 5ng¹¹⁾,

diclofop-methyl 5ng¹⁰⁾, fenitrothion 0.02ng¹²⁾, chlorophyniphos-methyl 0.3ng¹²⁾, pirimiphos-methyl이 0.01ng¹²⁾이라고 보고 하였는데 ELISA에 의한 quizalofop-ethyl의 검출능력은 유사한 화학적 구조를 갖는 diclofop-methyl과는 비슷하지만 fenitrothion chlorophyniphos-methyl, pirimiphos-methyl 보다는 떨어지는 것으로 나타났다.

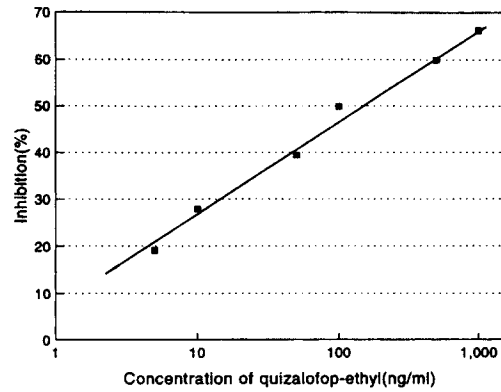


Fig 3. Elisa standard curve for quizalofop-ethyl.

Table 3. Recovery of quizalofop-ethyl from fortified soil by ELISA.

Fortified level(ppm)	0.1	0.05
Recovery*(%)	95.4	96.5

* Average of triplicates

ELISA를 이용한 토양중 quizalofop-ethyl의 회수율 실험 결과는 table 3과 같이 0.1ppm과 0.05ppm에서 각각 95.4, 96.5%의 높은 회수율을 보여 ELISA에 의한 quizalofop-ethyl의 잔류량 분석이 가능함을 시사해 주었다.

Gas chromatography에 의한 quizalofop-ethyl의 分析

GLC에 의한 quizalofop-ethyl의 분석을 위한 chromatogram에서 quizalofop-ethyl의 retention time은 2.26분대였다. Quizalofop-ethyl의 ECD에 대한 반응은 5ppb에서 45ppb까지 직선적으로 증가하였으며, GLC에 의한 quizalofop-ethyl 검출 한계는 5ppb로서 quizalofop-ethyl이 ECD에 매우 민감함을 알 수 있었다.

토양중에서 quizalofop-ethyl의 GLC 분석 가능성을 검토하기 위하여 quizalofop-ethyl을 spiking하여 회수율을 시험한 결과 Table 4에서와 같이 quizalofop-ethyl의 회수율은 농도가 증가함에 따라 낮아지는 경향이었으나 4수준 모두 90% 이상의 높은 수준을 유지하였다. Quizalofop-ethyl 분자구조내

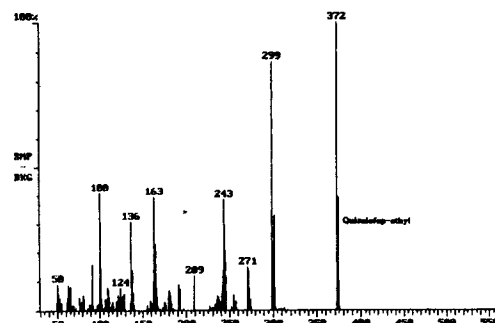


Fig. 4. GC-MS spectra of quizalofop-ethyl

에 ether결합을 가지고 있어 GLC로 분석하는 도중 분해되어 미지의 물질이 검출될 가능성을 해소하기 위하여 GC/MS로 확인하였는데 Fig. 10의 spectra에서 보는 바와 같이 quizalofop-ethyl은 372m/z로 나타나 quizalofop-ethyl이 분석도중 분해되지 않고 모화합물 자체가 GC/ECD에 의해 검출되는 것으로 나타났다.

Table 4. Recovery of quizalofop-ethyl from fortified soil by GLC.

Fortified level (ppm)	0.15	0.30	0.45	0.60
Recovery*(%)	100	100	90.7	89.2

* Average of triplicates

HPLC에 의한 quizalofop-ethyl 분석

고속 액체크로마토그래피를 이용하여 토양중에 잔류하고 있는 quizalofop-ethyl을 분석하기 위한 실험에서 얻은 chromatogram은 Fig. 5와 같다. 본 실험 조건하에서 quizalofop-ethyl의 retention time은 6.08분이었다.

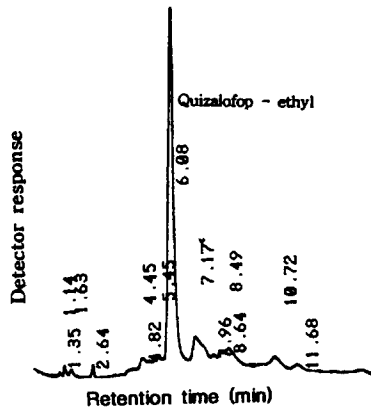


Fig 5. Chromatogram of quizalofop-ethyl in soil by HPLC

Quizalofop-ethyl 정량을 위한 표준 곡선은 0.1ppm에서 4.0ppm까지는 quizalofop-ethyl의 농도가 증가함에 따라 직선적으로 peak높이가 증가하였으나 4ppm이상에서는 직선적이지 못하였다. 또 HPLC에 의한 최소 검출한계는 0.1ppm이었다.

본 실험방법의 신뢰도를 나타내는 회수율 실험을 위해 토양에 처리한 4수준의 quizalofop-ethyl의 농도에서는 89.5% 이상의 회수율을 보여주었다.(table 5)

要 約

종래에 사용해 오던 HPLC에 의한 quizalofop-ethyl의 분석법을 개선시키고, 또한 ELISA와 GLC를 이용한 새로운 quizalofop-ethyl분석법을 개발하고자 시험을 수행한 결과는 다음과 같다.

ELISA 실험에서 적정배양온도는 37℃였으며 배양시간은 4시간이었다. Coating antigen의 적정수준은 20µl/ml이며 검출 한계는 5ppb이고 회수율은 95% 이상이었다. 또 GLC와 HPLC에 의한 검출한계는 5ppb, 100ppb였으며, 토양에서의 회수율은 95.4, 89.5% 이상으로 나타났다. 이상에서 보는 바와 같이 ELISA와 GLC에 의한 quizalofop-ethyl분석법이 HPLC에 의한 것보다 양호한 것으로 나타났다.

參考文獻

1. Worthing, C. R. (1991) Pesticide manual, The British crop protection council, p.753.
2. Edward, S. L., J. H. Skeritt, A. S. Hill, H. L. Beasley, and D. P. Mc Adam(1992) pesticide Residues in Malting Barley : New simple and rapid Test Methods for Breweries, The institute of Brewing Australia and New-zealand section, Proceeding of the Twenty-second convention, 1~6 March : 30~36
3. Engvall, E., P. Perlman (1972) Enzyme-Linked Immunosorbent assay, ELISA I. Quantitation of specific antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in antigen-coated Tubes. The J. Immunology., 109(1) : 129-135
4. Jung, F., S. J. Gee, R. O. Harrison, M. H. Goodrow, A. E. Karu, A. L. Braun, Q. X. Li, and B. D. Hammock (1989) use of Immunochemical Techniques for the Analysis of pesticides, Pesti. Sci., 26 : 303-317
5. Martens, R. (1978) Degradation of the herbicide 14C-Diclofop-methyl in soil under Different condition. Pesti. Sci., 9 : 127-134
6. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. F and R. J. Randell (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275
7. Lee, Kang-Bong, Im, Geon-Jae, Jung, Young-Ho and Suh, Yong-Tack(1994) production of polyclonal Antibody and optimum condition in ELISA for metalaxyl, korean J. Environ. Agriculture, 13(1) : 76-82.
8. Hammock, D., zurdoki, F. H. K. M. Bekheit, M. P. Marco, M. H. Goodrow, and B. (1992) yntethesis of Heptens and Conjugates for and Enzyme Immunoassay for analysis of the herbicide. J. Agri., Food Chem., 40 : 1459-1469
9. Riggle, B., and B. Dunbar (1990) Developement of Enzyme Immunoassay for the Detection of the Herbicide Norflurazon. J. Agri., Food Chem., 38 : 1992-1925
10. Schwalbe, M., F. Dorn and K. Beyermann (1984) Enzyme Immunoassay and Fluoroimmuoassay for the Herbicide Diclofop-methyl. J. Agri., Food Chem., 32 : 734-741
11. Suh, Yong-Tack, Shim, Jae-Han and Lee, Kang-Bong (1992) Development and Application of Enzyme Immunoassay for Endosulfan Residue Analysis, korean J. Environ, Agriculture, 11(1) : 59~65.
12. Skeritt, J. H., A. S. Hill, H. L. Beasley, S. L. Edward, and D. P. McAdmam (1992) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Organophosphate Pesticides : Fenitrothion, Chloropyriphos-methyl, and Pirmphos-methyl in wheat Grain and Flour-Milling Fractions. J. of, AOAC, 75(3) : 519-528